



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms (脂肪酸結合タンパク 4 はアデニル酸シクラーゼ-PKA およびグアニル酸シクラーゼ-PKG 経路を介して脂肪分解とともに脂肪細胞から分泌される)
Author(s) 著 者	美田, 知宏
Degree number 学位記番号	乙第 2926 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2017-02-06
Original Article 原著論文	Obesity 2015, 23: 359-367
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	乙第 2926 号	氏 名	美田 知宏
<p>論文題名</p> <p>FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms</p> <p>(脂肪酸結合タンパク4はアデニル酸シクラーゼ-PKAおよびグアニル酸シクラーゼ-PKG経路を介して脂肪分解とともに脂肪細胞から分泌される)</p> <p>【研究目的】</p> <p>脂肪酸結合タンパクは長鎖脂肪酸と結合能を有する約 14～15kDa のタンパク質である。この中で脂肪酸結合タンパク 4 (FABP4) は脂肪細胞とマクロファージに高発現し、インスリン抵抗性および動脈硬化の進展に重要な役割を担うことが示されている。最近、マウスの検討から FABP4 特異的阻害薬が糖尿病や動脈硬化に対する新規の治療戦略となり得る事が報告された。FABP4 はシグナルペプチドを有していないものの、脂肪細胞から分泌される事が報告され、肝臓での糖新生亢進を介してインスリン抵抗性を惹起する新規のアディポカインであることが示された。しかしながら、血中 FABP4 濃度の食物摂取による変化とその調節機構や FABP4 分泌における細胞内シグナル伝達経路は明らかではない。そこで本研究は、経口ブドウ糖負荷試験および高脂肪食負荷試験における血中 FABP4 濃度の変化を検討した。さらに、3T3-L1 脂肪細胞を用いて各種液性因子による FABP4 の分泌誘導やその制御シグナル伝達経路の検討を行った。</p> <p>【研究方法】</p> <p>「研究 1」 経口ブドウ糖負荷試験による血中 FABP4 濃度の変化の検討</p> <p>地域住民対象のコホート研究である端野・壮瞥町研究で、2010 年に健診を受診した壮瞥町在住の 615 名 (男/女: 264/351, 平均年齢 64.9 歳) を対象とした。前日の夜間絶食後、朝 6 時～9 時の間に身体測定後、末梢静脈血採血を行った。空腹時血糖が 100-125 mg/dl 及び/もしくは HbA1c (NGSP) が 5.6-6.4%である者に、75g 経口ブドウ糖負荷試験を勧めたところ、結果として計 53 名 (男/女: 25/28, 平均年齢 66.0 歳) が了承し、負荷試験が施行された。負荷直前、1 時間後、2 時間後に採血され、血漿中のグルコース濃度、インスリン濃度、FABP4 濃度を計測した。</p> <p>「研究 2」 高脂肪食負荷試験による血中 FABP4 濃度の変化の検討</p>			

関連医療施設の外来を受診した患者のうち、年齢 33-53 歳のうち脂質降下薬や糖尿病治療薬を直近 12 週間未使用で、重度の肝・腎障害や動脈硬化性疾患を有さない 35 名を対象とした。少なくとも 12 時間以上の夜間絶食後、朝食としてハンバーガー、アップルパイおよびコーラを含む高脂肪食 (総カロリー: 1001 kcal, 脂質: 61.4 g, タンパク質: 31.6 g) を摂取させた。食事は 20~30 分で摂取させて、食事の直前、2 時間後、4 時間後、6 時間後に採血を行い、血漿中のグルコース濃度、インスリン濃度、中性脂肪値、FABP4 濃度を計測した。

「研究 3」 3T3-L1 脂肪細胞からの FABP4 分泌機構の検討

3T3-L1 細胞を既報の方法で脂肪細胞に分化させ、各種刺激剤を 2 時間投与後に細胞成分 (cell lysate, CL) と培養液 (conditioned medium, CM) に分けて採取した。採取した CL と CM に加え、CM の一部は、エクソソーム及び小胞様オルガネラを含む分画 (EM) とそれ以外の分画 (non-EM) に超遠心法で分離して検討を行った。FABP4 の分泌はウェスタンブロット法で評価した。また、脂肪分解の評価として、比色分析法を用いて CM へ放出された遊離脂肪酸を定量した。

【実験成績】

「実験 1」

経口ブドウ糖負荷試験によりグルコース濃度及びインスリン濃度は有意に上昇し、2 時間後も高値が維持された。一方、FABP4 濃度は前値よりも 12.9%低下した。

「実験 2」

高脂肪食負荷により、グルコース濃度は食後から 4 時間後にかけて漸減した。インスリン濃度は 2 時間後で有意に上昇し、その後漸減した。中性脂肪値は徐々に上昇し、食後 4 時間で頭打ちとなった。FABP4 濃度は食後 4 時間で前値より 20.7%漸減し、その後緩やかに回復傾向となった。

「実験 3」

実験 1 及び 2 の結果から、グルコース、インスリン、脂質などが FABP4 の分泌を制御している可能性が示唆されされたため、3T3-L1 脂肪細胞を用いて、刺激剤として、グルコース (高濃度: 1 mg/dl または低濃度: 4.5 mg/dl)、0.5 μ g/ml インスリンに加え、脂質として 1 mM パルミチン酸、インスリンの抗脂肪分解作用の逆作用として 10 μ M イソプロテレノール (汎 β 受容体刺激薬)、0.5 mM db-cAMP (β 受容体の下流のプロテインキナーゼ A [PKA]刺激剤) を 2 時間処置して FABP4 の分泌を検討した。

ウェスタンブロット法により FABP4 は CL と CM の双方で検出されたものの、非分泌タンパクである GAPDH は CM では検出されなかったことから、FABP4 は細胞膜障害によって放出される逸脱ではなく、脂肪細胞から分泌されていることが確認された。

低濃度～高濃度グルコース、インスリン、パルミチン酸による単独刺激は FABP4 の分泌には影響を及ぼさなかった。一方、イソプロテレノール及びその下流を担う db-cAMP の処置は FABP4 の分泌を増加させ、その結果は用量依存的であった。これらの刺激に cAMP を 5'-AMP へと変換する作用を持つインスリンで同時に処置したところ、FABP4 分泌は抑制された。また、イソプロテレノールによる FABP4 の分泌は、PKA 阻害薬である H-89 を同時に処置することで抑制された。

次に、 $\beta 3$ 選択的刺激剤である CL316243 で処置したところ、脂肪細胞からの FABP4 分泌は濃度依存的に増加し、その作用はインスリンや H-89 処置により減弱した。アデニル酸シクラーゼ (AC) 刺激剤であるフォルスコリン処置でも FABP4 の分泌は増加し、その作用はインスリンや H-89 の処置により抑制された。

ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR-A) を介したグアニル酸シクラーゼ (GC)-プロテインキナーゼ G (PKG) シグナル経路の刺激剤である心房ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の処置も FABP4 の分泌を濃度依存性に増加させた。また、ANP に PKG 阻害薬である KT5823 を同時に処置させることにより、FABP4 の分泌は抑制された。

イソプロテレノールによる PKA を介する FABP4 分泌と ANP による PKG を介する FABP4 分泌の増加は、脂肪分解の経路の最終段階であるホルモン感受性リパーゼ (HSL) 阻害剤である CAY10499 によって抑制された。さらに、脂肪分解の指標である CM への遊離脂肪酸の放出を検討したところ、AC-PKA シグナル刺激剤および GC-PKG シグナル刺激剤により増加し、これらの経路の阻害薬や HSL 阻害薬の同時処置により抑制されることを確認した。

イソプロテレノール刺激による FABP4 の分泌は、CM 中の EM 分画及び non-EM 分画双方に認められたが、non-EM に比較し EM 分画の FABP4 分泌の方が少量であった。一方、ANP 刺激による FABP4 の分泌は、EM 分画ではほとんど認められなかった。

【考察】

今回の検討から、脂肪分解のシグナル経路の制御下に FABP4 は脂肪細胞から分泌されることが明らかとなった。HSL 活性化による脂肪分解の促進には 2 つの独立した経路、 β 受容体刺激による AC-PKA 経路と NPR-A 刺激による GC-PKG 経路が知られている。イソプロテレノール、CL316243、フォルスコリン、db-cAMP による AC-PKA 経路の活性化と ANP による GC-PKG 経路の活性化は脂肪細胞からの FABP4 分泌を増加させた。一方、FABP4 の分泌はインスリンや H-89 による AC-PKA 経路の抑制、KT-5823 による GC-PKG 経路の抑制、さらには CAY10499 による HSL 抑制により減弱が認められた。FABP4 は HSL と結合してタンパク-タンパク相互作用で脂肪分解を誘導することが報告されているが、FABP4 は単に脂肪分解を制御して脂肪滴から脂肪酸を生成するのみならず、生成された脂肪酸と結合して細胞内外における脂肪酸の運搬や利用を担う二重の作用を持つことが示された。

今回の検討結果は、ヒトにおいて食後に血中 FABP4 濃度が有意に減少することを初

めて示した。この結果は、マウスの血中 FABP4 濃度が絶食により上昇し、食餌により低下したという以前の報告と一致している。経口ブドウ糖負荷試験と高脂肪食負荷試験の比較で、血中グルコース濃度の増減の傾向は正反対であったが、インスリン濃度は双方の負荷ともに増加傾向を示した。さらに、高脂肪食負荷試験においては中性脂肪値の増加が認められた。これらの所見から、グルコースではなく、インスリンもしくは脂質が血中 FABP4 濃度の変化や FABP4 の分泌に影響を与えることが示唆された。脂肪酸の長期間の刺激により脂肪細胞中の FABP4 の発現が増加するという報告はあるが、今回の *in vitro* の実験では脂肪酸であるパルミチン酸の 2 時間処置では FABP4 分泌の増加は認められなかった。一方、インスリン処置は 3T3-L1 脂肪細胞からの刺激剤による FABP4 分泌誘導を減少させた。これらの成績から、経口ブドウ糖負荷試験や高脂肪食負荷試験による FABP4 濃度の低下は、インスリンによる抗脂肪分解作用に伴う脂肪細胞からの FABP4 の分泌低下によることが考えられた。

FABP4 のアミノ酸配列には小胞体-ゴルジ体経由のいわゆる古典的経路を介する分泌に必須なシグナルペプチドが存在しない。しかし、真核細胞には小胞体-ゴルジ体非依存性にタンパク質が分泌される経路もあることが知られている。FABP4 の分泌は小胞体-ゴルジ体への輸送を阻害するブレフェルジンやモネンシンでは抑制されないという以前の報告は、FABP4 の分泌が非古典的経路によることを示唆している。ヒトの脂肪細胞を用いた検討で、細胞内カルシウム濃度を上昇させるイオノマイシンによって FABP4 分泌が増加し、カルシウム依存性の非古典的経路による分泌制御の可能性もある。また、脂肪細胞由来の小胞様オルガネラ (EM 分画) から FABP4 が分泌されることも示されたが、今回我々は EM 分画よりも non-EM 分画からの FABP4 分泌が優位である事を確認した。今回の検討において、EM 分画と non-EM 分画ともにイソプロテレノールによる FABP4 の分泌亢進がインスリンで抑制された一方、ANP 刺激では EM 分画に FABP4 の分泌がほとんど確認できなかった。このことは、イソプロテレノール刺激に比し ANP 刺激による FABP4 の分泌が少ないことが一要因と考えられた。これまでの結果を総合すると、FABP4 は非古典的経路により分泌され、その一部は EM 分画からと考えられる。分泌の制御には、今回示した AC-PKA 経路と GC-PKG 経路のみならず細胞内カルシウムに依存した機序も関連するが、それぞれの制御機構の関係性に関しては今後さらなる検討が必要である。

【結語】

FABP4 は AC-PKA 及び GC-PKG シグナル経路を介した脂肪分解と関連して脂肪細胞より分泌される。ヒトにおいて血中 FABP4 濃度は食後に漸減すること、またその機序として、増加したインスリンが脂肪分解を抑制し、FABP4 分泌を低下させる事を寄与することを明らかにした。今後、FABP4 分泌機構を詳細に解明することにより、心血管・代謝疾患の新規の治療戦略開発に応用できる可能性がある。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 29 年 2 月 6 日授与)

報告番号	乙第 2926 号	氏 名	美田 知宏
論文審査 担 当 者	主査 教授 三浦 哲嗣	副査 教授 堀尾 嘉幸	
	副査 教授 當瀬 規嗣	委員 教授 櫻井 晃洋	

学位論文 の題名	FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms (脂肪酸結合タンパク 4 はアデニル酸シクラーゼ-PKA およびグアニル酸シクラーゼ-PKG 経路を介して脂肪分解と共に脂肪細胞から分泌される)
結果の要旨 本研究は、ヒトにおける脂肪酸結合蛋白 4 (fatty acid binding protein4, FABP4) の食物摂取による血中動態変化とその機序を、臨床例を対象にしたブドウ糖負荷試験、高脂肪食負荷試験、ならびに培養脂肪細胞を用いた <i>in vitro</i> 実験から検討したものである。研究結果は、FABP4 の脂肪細胞からの分泌が、アデニル酸シクラーゼ-Protein kinase A ならびにグアニル酸シクラーゼ-Protein kinase G シグナル経路を介した脂肪分解と関連していることを示し、ヒトにおいて血中 FABP4 濃度は食後に漸減すること、またその機序として分泌亢進したインスリンが脂肪分解を抑制し、FABP4 分泌を低下させる事が寄与することを示した。これらの研究結果は、ヒトにおける食事性の血中 FABP4 変動の特徴とその機序を初めて明らかにし、これまで詳細が明らかではなかった脂肪細胞における FABP4 分泌機構の一端を解明したものであり、学位に値するという評価で審査員全員が一致した。	